DOI:10.11931/guihaia.gxzw201906037

鹅掌楸 *AOX* 家族基因克隆与组织表达分析

宗亚仙，郝自远，王曦，温少莹，李火根*

(南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 南京 210037)

摘　要：交替氧化酶（AOX）为植物呼吸作用电子传递链末端氧化酶，广泛存在于高等植物中，研究表明 AOX 在植物生长发育及适应性方面有着重要作用。鹅掌楸（*Liriodendron chinense*）为重要的珍贵用材及园林观赏树种，开展抗逆基因的研究，对于提高鹅掌楸适应性有重要意义。该文以鹅掌楸为研究对象，通过采用 RT-PCR 与 RACE 相结合的方法克隆获得 3 个 *AOX* 基因，其 ORF 长分别为 858 bp、1 032 bp 和 1 044 bp，相应编码氨基酸数为 285 aa、343 aa 和 347 aa，分别命名为 *LcAOX1a*、*LcAOX1b* 和 *LcAOX2*。蛋白同源性分析发现鹅掌楸 *AOX* 家族蛋白序列高度保守，尤其在 C 端保守性极高，且均含有“EXXH”、“EEE-Y”铁离子结合保守结构域。亚细胞定位分析结果显示 *LcAOX1a* 蛋白定位于线粒体及叶绿体之外的其他位置，*LcAOX1b* 蛋白在叶绿体和线粒体中均有定位，*LcAOX2* 蛋白定位于线粒体基质。采用 RT-qPCR 方法研究 *AOX* 基因在鹅掌楸茎、叶片、叶芽、花芽、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊 8 个不同组织中的表达模式，分析发现鹅掌楸 *AOX* 基因在花器官中表达量明显高于营养器官，*LcAOX1a* 与 *LcAOX1b* 基因在雄蕊中表达量最高，特别是 *LcAOX1a* 基因在雄蕊中特异性表达，其表达量远远高于其他组织；而 *LcAOX2* 基因在花瓣中表达量最高。该研究克隆 3 个 *AOX* 基因并进行相关分析，为进一步研究其生物学功能奠定基础。

关键词：鹅掌楸，交替氧化酶，基因克隆，生物信息学分析，组织表达

中图分类号：S722.3+6　　　**文献标识码：**A

Molecular isolation and expression analysis of *Alternative Oxidase* genes in *Liriodendron Chinensis*

Zong Yaxian, Hao Ziyuan, Wang Xi, Wen Shaoying, Li Huogen*

(*Southern Modern Forestry Collaborative Innovation Center, Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037, China)

Abstract: Alternative oxidase, a terminal oxidase located in respiration electron-transport pathway, which is widely existed in higher plants and closely related to plant respiration. It has shown that AOX played a substantial role in plant growth, seedling morphogenesis and environmental adaptability in recent researches. *Liriodendron chinensis* is an excellent tree species for garden ornaments and timber use, while the adaptive capacity prevents the expansion of cultivated area. As a result, searching for resistant genes of *L. chinensis* and uncovering the mechanism of its stress-defence ability are great urgency. Three *AOX* genes were isolated from *L. chinensis* by RT-PCR and RACE, and then sequence analysis was carried out *in silico*, including

基金项目：国家自然科学基金（31770718，31470660）；江苏省高校优势学科（PAPD）项目[Supported by the National Natural Science Foundation of China（31770718, 31470660）; Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions（PAPD）]。

作者简介： 宗亚仙（1994-），女，河南新乡人，硕士研究生，主要从事林木分子研究（E-mail）1165269833@qq.com。

***通信作者：**李火根，博士，教授，主要从事林木遗传育种研究（E-mail）hgli@njfu.edu.cn。

analysis of open reading frames, encoded amino acid sequences, protein domains, secondary structures and so on. The open reading frame length of *AOX* genes were 858 bp, 1 032 bp and 1 044 bp, which encoded 285, 243 and 247 amino acids, respectively, and then we named the genes as *AOX1a*, *AOX1b* and *AOX2*. Protein homology and phylogenesis analysis revealed that the *AOX* family protein sequences of *Liriodendron chinense* were highly conserved, especially at the C-terminus, and all the three *AOX* genes contained "EXXH", "EEE-Y" iron-binding conserved domains, those may have activity in combination with iron ions. Subcellular localization analysis showed that *LcAOX1a* protein was localized in other places outside the chloroplast and mitochondria. *LcAOX1b* protein was localized in chloroplast and mitochondria, while *LcAOX2* protein was localized in mitochondrial matrix. The expression patterns of *AOX* genes were examined by using eight tissues, including stem, leaf, leaf bud, flower bud, calyx, petal, stamens and pistil. The result of RT-qPCR indicated that relative quantity (RQ) of *LcAOX1a LcAOX1b* and *LcAOX2* genes in floral organs was significantly greater than that in vegetative organs. The RQ value of *LcAOX1a* and *LcAOX1b* was the highest in the stamens, especially the *LcAOX1a*, the expression in the stamens was much higher than other tissues. The *LcAOX2* gene has the highest RQ value in the petals. This study cloned three *LcAOX* genes and performed bioinformatics analysis, subcellular localization analysis and expression patterns analysis to provide reference for further study of their biological functions.

Keywords: *Liriodendron chinensis*, alternate oxidase, gene cloning, bioinformatics analysis, tissue expression

高等植物线粒体有两条重要的电子传递途径：细胞色素途径和交替途径（也称抗氰呼吸途径）。正常情况下植物以细胞色素途径为主：通过一系列电子传递复合体，最终将电子传递给氧而形成水，产生的化学能同 F_0F_1-ATPase 偶联形成 ATP，但该过程中电子传递途径上有三个磷酸化部位，对氰化物敏感；在植物受到逆境胁迫时细胞色素途径被抑制而交替途径增强：交替途径是一条从泛醌库开始分支并以交替氧化酶（alternative oxidase，AOX）为末端氧化酶的电子传递途径，电子从还原状态的泛醌直接传递给分子氧形成水，能量以热能形式散失（Vanlerberghe et al., 1997）。现有的研究结果表明，在植物逆境胁迫影响下，*AOX* 基因表达量显著提高，细胞内 *AOX* 蛋白丰度显著提高来应对不良环境对细胞造成的损伤。Bonner & Rich（1986）在 1986 年首次从天南星科斑叶阿诺母（*Arum maculatum*）线粒体中分离得到 *AOX*，并确定该蛋白与其开花产热有关。Zalutskaya et al.（2015）在对衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）热处理后交替呼吸显著增强，*AOX1* 基因表达量上调。此外，在对拟南芥冷处理、干旱胁迫处理，以及对蒺藜苜蓿盐胁迫处理等逆境条件处理下均观察到交替呼吸增强，且转 *AOX* 基因植物对胁迫适应能力有显著提高（Chinnusamy et al.，2007；Campos et al.，2016； Jian et al.，2016；Keunen et al.，2016）。

木兰科(Magnoliaceae)鹅掌楸(*Liriodendron chinensis*)为第三纪孑遗树种，是被子植物中最原始的类群之一，鹅掌楸又名马褂木，为中国特有树种，天然更新能力差，种子繁殖适合度低，自然群落中种群数量小，种群内个体数目少，且星状分布于我国西南、中东及越南北部，群体间基因交流受到严重影响，处于濒危状态，现已被列入国家二级珍稀濒危保护植物名录（郝日明等，1995）。鹅掌楸作为从裸子植物向被子植物过渡的树种，对研究有花植物的起源、分布和系统发育有重要价值（李康琴，2013），并且作为优良的园林观赏及高档家具用材树种，也有着非常重要的经济价值。拥有广泛的适应性是一个树种推广利用的前提，因此，从林木遗传改良角度，挖掘和研究抗性相关基因、提高鹅掌楸适应性对于鹅掌楸抗性育种有着重要的意义。据于此，本文以鹅掌楸为研究对象，利用 RACE 技术筛选并克隆鹅掌楸 *AOX* 家族基因，进行生物信息学分析，组织表达特性分析，期望为今后开展其抗逆功

能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验所用鹅掌楸（种源为浙江松阳 SY）叶片、茎、叶芽、花芽、花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊组织材料均来源于南京林业大学下蜀实习林场鹅掌楸种源试验林，样品采集后迅速放入液氮中速冷，后置于-80 ℃超低温冰箱中保存备用。实验所用大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell、pEASY-T1 Cloning Kit 和 pEASY-Blunt Cloning Kit 克隆载体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鹅掌楸 *AOX* 家族基因 EST 序列的挖掘

对北美鹅掌楸转录组数据库（http://ancangio.uga.edu/content/liriodendron-tulipifera）进行检索，搜索到所有 *AOX* 基因 EST 片段并导出，将本实验室测得的鹅掌楸转录组数据同北美鹅掌楸转录组数据库中挖掘到的所有 EST 片段进行 BLAST 比对，筛选得到鹅掌楸 *AOX* 同源基因 EST 片段。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

采用 TIANGEN 公司的植物总 RNA 提取试剂盒 RNAprep pure Plant Kit（DP432）提取鹅掌楸叶片、花瓣、雄蕊和雌蕊四个组织混合样品的 RNA。以提取的 RNA 为模板，使用 Thermo Fisher Scientific 公司反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 第一链的合成；使用 3’-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase（TaKaRa）试剂盒进行 3’RACE 反转录；用 SMARTer® RACE 5’/3’ Kit 试剂盒（TaKaRa），进行 5’RACE 反转录，在反转录前，重新检测所提取的 RNA 完整性，保证 RNA 无降解。

1.2.3 基因全长 cDNA 序列的获取

以获取的 EST 序列为基础，利用 Oligo 7 软件设计中间片段引物（表 1），以上一步获得的 cDNA 第一链为模板，进行 LA Taq（TaKaRa）PCR 扩增，扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后切取目的片段，回收、纯化并连接到 pEASY-T_1 载体，转化 Trans1-T_1 感受态，挑取阳性单克隆由南京金斯瑞生物科技有限公司测序，获取目的基因中间片段序列。根据克隆测序获得的 3 个 *AOX* 基因中间片段序列，设计 3’和 5’RACE 引物（表 1），采用巢式设计，通过 Outer 和 Inner 两轮 PCR 反应，对目的基因 3’和 5’末端进行快速扩增，获得目的基因 3’和 5’端序列。将所获得的中间片段、3’RACE 与 5’RACE 通过 BioXM 软件进行电子拼接，并将拼接后的基因全长在 NCBI 数据库中进行比对，利用在 NCBI 中的 ORF Finder 在线预测基因的 ORF 序列，根据预测的 ORF 序列在其两端设计全长引物（表 1），进行 PCR 扩增获得目的基因 ORF 序列。

1.2.4 基因的生物信息学分析

利用生物信息学软件对获得的 *AOX* 基因进行开放阅读框、编码的氨基酸序列、蛋白质结构域以及二级结构等进行分析。通过 ORF finder（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）进行 ORF 及编码氨基酸序列的预测；在 Expasy ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）进行蛋白质氨基酸组成、分子量、理论等电点分析；使用 Pfam（http://pfam.xfam.org/）进行蛋白质结构域分析；蛋白质序列跨膜区分析采用在线工具 ExPASy TMpred（http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html）；使用 signalP 4.1 Sever（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）进行信号肽分析；使用 SOPMA 进行蛋白质二级结构预测；分别利用 TargetP 1.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/）及 Wolfpsort（https://wolfpsort.hgc.jp/）进行亚细胞定位预测；最后在 NCBI 搜索下载已发表的 *AOX* 同源序列进行分析，采用 MEGA5.1 进行系统进化树构建。

1.2.5 基因的组织表达分析

提取鹅掌楸叶片、茎、叶芽、花芽、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊 8 个不同组织的 RNA，将提取的RNA样品稀释到统一浓度(250 ng ·μL^{-1})，反转录呈cDNA。根据克隆获得的*AOX1a*、*AOX1b* 和 *AOX2* 基因序列，采用 Oligo 7 软件设计 qPCR 引物（表 1），用 *Actin97* 作为内参基因，进行实时定量 PCR 反应，检测目的基因在 8 种不同组织中的表达量，每个样品设置 3 个重复，反应体系和程序参照 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)（TaKaRa）说明书。

表 1 基因克隆及 qPCR 扩增引物

Table1 Primers sequence for gene cloning and qRT-PCR

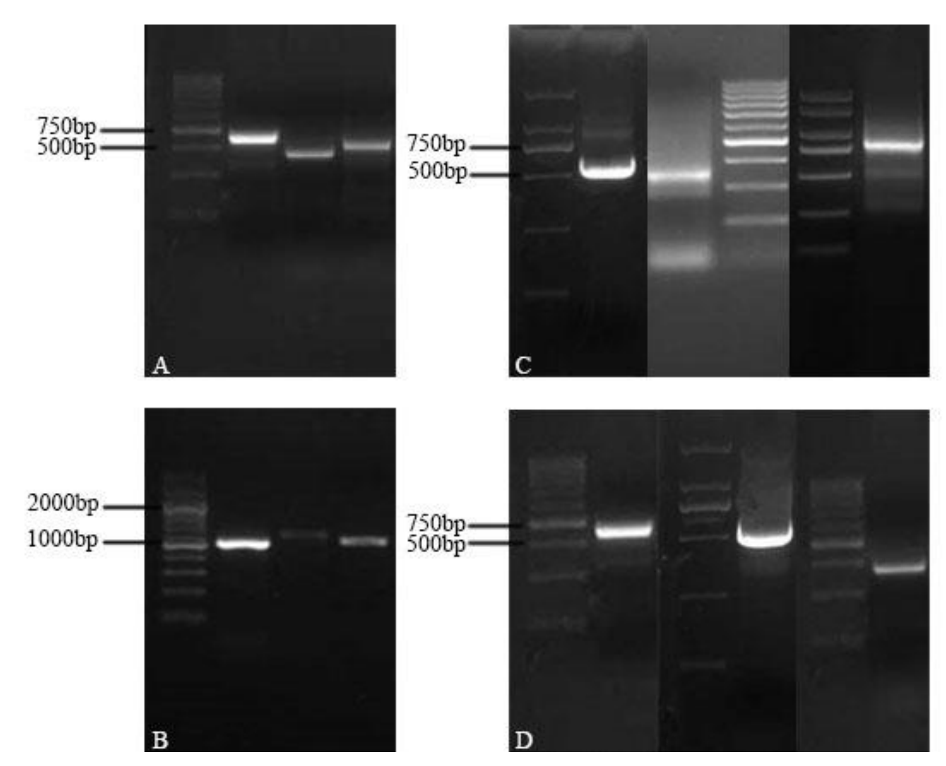
基因 Gene	引物类型 Type of primers	引物名称 Primer name	序列 Primer sequence	退火温度 Annealing Temperature (℃)
LcAOX1a	中间片段引物 Primers of intermediate fragment	*LcAOX1a*-F	TGGTGCGGTGAAGGGAGAAG	53
		LcAOX1a-R	ACCCATGAAATACGCATTGA	
	3’-RACE 引物 Primers of 3’-RACE	*LcAOX1a*-3F1	TTAGAAGAAGCCGAGAACGAG	56
		LcAOX1a-3F2	ACTCGTCTTCGCCGTCTAAGG	61
	5’-RACE 引物 Primers of 5’-RACE	*LcAOX1a*-5R1	GCATCCTCTCGTTCTCGGCTTCGTC	66
		LcAOX1a-5R2	ATCAGTGGGTAATCTCAGTATC	54
	ORF 引物 Primers of ORF	*LcAOX1a*-OF	TTTCGTTCCAATTTCTTGCGAGACA	61
		LcAOX1a-OR	GAGCCGAAACTCAGTGGTACCCAA	
	实时荧光定量 PCR 引物 Primers of qPCR	*LcAOX1a*-qF	ATGTTCCAGCCACATTGTCG	60
		LcAOX1a-qR	GAATCGCCTCAGTGACTTGC	
LcAOX1b	中间片段引物 Primers of intermediate fragment	*LcAOX1b*-F	ACGTTCATGGAAGTAGCCAA	52
		LcAOX1b-R	ATCCGATTCCAATTACAATTTC	
	3’-RACE 引物 Primers of 3’-RACE	*LcAOX1b*-3F1	AGGCGTCTTCTTCAATGCATATTTC	59
		LcAOX1b-3F2	GCTGAAAGAATCTCCGGCCCCAC	66
	5’-RACE 引物 Primers of 5’-RACE	*LcAOX1b*-5R1	GAGTGCCTTTATCCATCCGCCGCTGT	69
		LcAOX1b-5R2	TGATTTCCACTTCCATTCCG	55
	ORF 引物 Primers of ORF	*LcAOX1b*-OF	ATGAACTCCAAACTAGCGACA	55
		LcAOX1b-OR	AAAGGTCCTAATACACGTCC	
	实时荧光定量 PCR 引物 Primers of qPCR	*LcAOX1b*-qF	ATCTGAAGAAGCACCACGTT	60
		LcAOX1b-qR	TCTAACATCATGGCCCGACA	
LcAOX2	中间片段引物	*LcAOX2*-F	GGAGCCATCAGAAATTACACC	52

Primers of intermediate fragment	*LcAOX2*-R	CTCTTTGAGAGCATCTGAGTG	
3’-RACE 引物 Primers of 3’-RACE	*LcAOX2*-3F1	GTTTGACCGTTTTCTTGCTC	55
	LcAOX2-3F2	GGAGAAGAATTGAAAAGAATGCCTG	60
5’-RACE 引物 Primers of 5’-RACE	*LcAOX2*-5R1	CAAATAATCAGCTCTTCTCCAC	61
	LcAOX2-5R2	CCTCCACGATAACTTCTTCCT	57
ORF 引物 Primers of ORF	*LcAOX2*-OF	CCCTAACTCTAGATCGGCAA	56
	LcAOX2-OR	TCAATGGTACCCAACTGGAG	
实时荧光定量 PCR 引物 Primers of qPCR	*LcAOX2*-qF	ATCTGACAAAGCACCATGTCC	60
	LcAOX2-qR	GCAGCTACTGTTTCGAGCATC	
内参引物 Internal reference primers	*LcACT97*-F	TTCCCGTTCAGCAGTGGTCG	60
	LcACT97-R	TGGTCGCACAACTGGTATCG	

2 结果与分析

2.1 鹅掌楸 *AOX* 家族基因 cDNA 全长序列克隆及命名

从北美鹅掌楸转录组数据库搜索到 *AOX* 基因相关的 EST 片段共 16 条，分别将其 EST 片段与本实验室鹅掌楸转录组数据（Yang，2013）比对、去重之后，共得到 3 条鹅掌楸 *AOX* 基因 EST 片段分别为 lcomp84206_c0、lcomp98789、lcomp99880_c0，并根据筛选出的 3 条鹅掌楸 *AOX* 基因 EST 序列设计中间片段特异性引物，通过 PCR 扩增、目的片段回收以及克隆测序，对转录组中 *AOX* 基因序列进行验证（图 1：A）。之后根据中间片段测序结果设计 RACE 引物，采用巢式扩增，获得 3’RACE（图 1：C）和 5’RACE（图 1：D）。最后，将中间片段、3’RACE 和 5’RACE 进行电子拼接获得全长，并在其 ORF 两端设计引物进行 ORF 验证（图 1：B），表明拼接结果无误。将克隆获得的 3 个 *AOX* 基因预测蛋白通过 NCBI BLAST Protein 与数据库进行比对，根据比对结果，将获得的目的基因依次命名为 *LcAOX1a*（MN187966）、*LcAOX1b*（MN187968）和 *LcAOX2*（MN187967）。



注：**A**. 中间片段；**B**.全长 ORF； **C**. 3’Race； **D**. 5’Race。

图中自左至右分别为 *LcAOX1a*、*LcAOX1b*、*LcAOX2*

Note: **A**. Intermediate fragment; **B**. Full length ORF; **C**. 3’Race; **D**. 5’Race.

From left to right *LcAOX1a*, *LcAOX1b*, *LcAOX2* respectively.

图 1 鹅掌楸 *AOX* 基因克隆

Fig. 1 PCR Amplification Result of *LcAOX* genes

2.2 鹅掌楸 *AOX* 家族基因编码蛋白理化性质分析

克隆出的 3 个 *AOX* 基因编码蛋白均含有 *AOX* 保守结构域，其中 *LcAOX1a*、*LcAOX1b* 为 *AOX1* 亚家族，*LcAOX2* 为 *AOX2* 亚家族成员，*LcAOX1a* 基因全长 1 305 bp，ORF 长 858 bp，编码 285 个氨基酸，理论等电点为 7.23，脂溶性蛋白指数为 80.11，不稳定系数为 36.17，疏水性平均值为-0.264。*LcAOX1b* 基因全长 1 405 bp，ORF 长 1 032 bp，编码 343 个氨基酸，理论等电点为 8.37，脂溶性蛋白指数为 85.04，不稳定系数为 39.71，疏水性平均值为-0.181。*LcAOX2* 基因全长 1 376 bp，ORF 长 1 044 bp，编码 347 个氨基酸，理论等电点 9.02，脂溶性蛋白指数为 89.94，不稳定系数为 48.17，疏水性平均值为-0.251。通过在线预测软件 ExPASy TMpred 对 *AOX* 蛋白跨膜区进行解析，结果显示 *AOX* 蛋白为典型的跨膜蛋白，且疏水性变化大的区域为其跨膜区。

2.3 鹅掌楸 *AOX* 家族基因编码蛋白同源性分析

分别将鹅掌楸 *AOX* 家族蛋白的 *LcAOX1a*、*LcAOX1b*、*LcAOX2* 与 NCBI 数据库数据库中序列进行比对，结果表明鹅掌楸 *AOX* 家族蛋白序列高度保守，尤其在 C 端保守性极高（图 2），且不同物种 *AOX* 蛋白均含有 AOX 家族特有的“EXXH”、“EEE-Y”铁离子结合保守结构域， 6 个保守的组氨酸残基可能参与铁离子的结合，1 个保守丝氨酸残基则与二硫键形成有关，因此，推测克隆出的 *LcAOX1a*、*LcAOX1b*、*LcAOX2* 基因作为双铁羧酸超基因家族成员，有着结合铁离子活性。

2.4 鹅掌楸 *AOX* 家族基因表达蛋白系统进化分析

从 NCBI 蛋白质数据库中搜索已发表的拟南芥（NP_188876.1、NP_188875.1、NP_189399.1、NP_201226.2）、水稻（*Oryza sativa* ,*Oryza glaberrima*）（BAA28773.1、

BAB71945.1）、胡萝卜（*Daucus carota* var. *sativa*）（ALI57378.1、ABZ81229.2、ABZ81230.2）、葡萄（*Vitis vinifera*）（ACI28876.1、NP_001268001.1）、番茄（*Lycopersicon esculentum*）（NP_001234117.2、NP_001309890.1）、大豆（*Glycine max*）（KHN42869.1、KHN39226.1）、西瓜（*Citrullus lanatus*）（ADD84880.1）等 19 个 *AOX* 家族同源蛋白，利用 MEGA5.0 软件将 3 个鹅掌楸 *AOX* 蛋白与数据库检索的蛋白序列进行多重序列比对，并用极大似然法构建系统进化树（图 3），*AOX* 蛋白明显分为两大支，即 *AOX1* 和 *AOX2*，从亲缘关系来看，*LcAOX1a* 和 *LcAOX1b* 聚为一个小的分支，与胡萝卜 *DcAOX1* 蛋白亲缘关系最近；而 *LcAOX2* 与胡萝卜 *DcAOX2a* 等蛋白亲缘关系较近。因此，该结果一方面说明了鹅掌楸在进化关系上与胡萝卜更为密切，另一方面，也符合 *AOX* 家族在 *AOX1* 和 *AOX2* 亚家族分类事实。

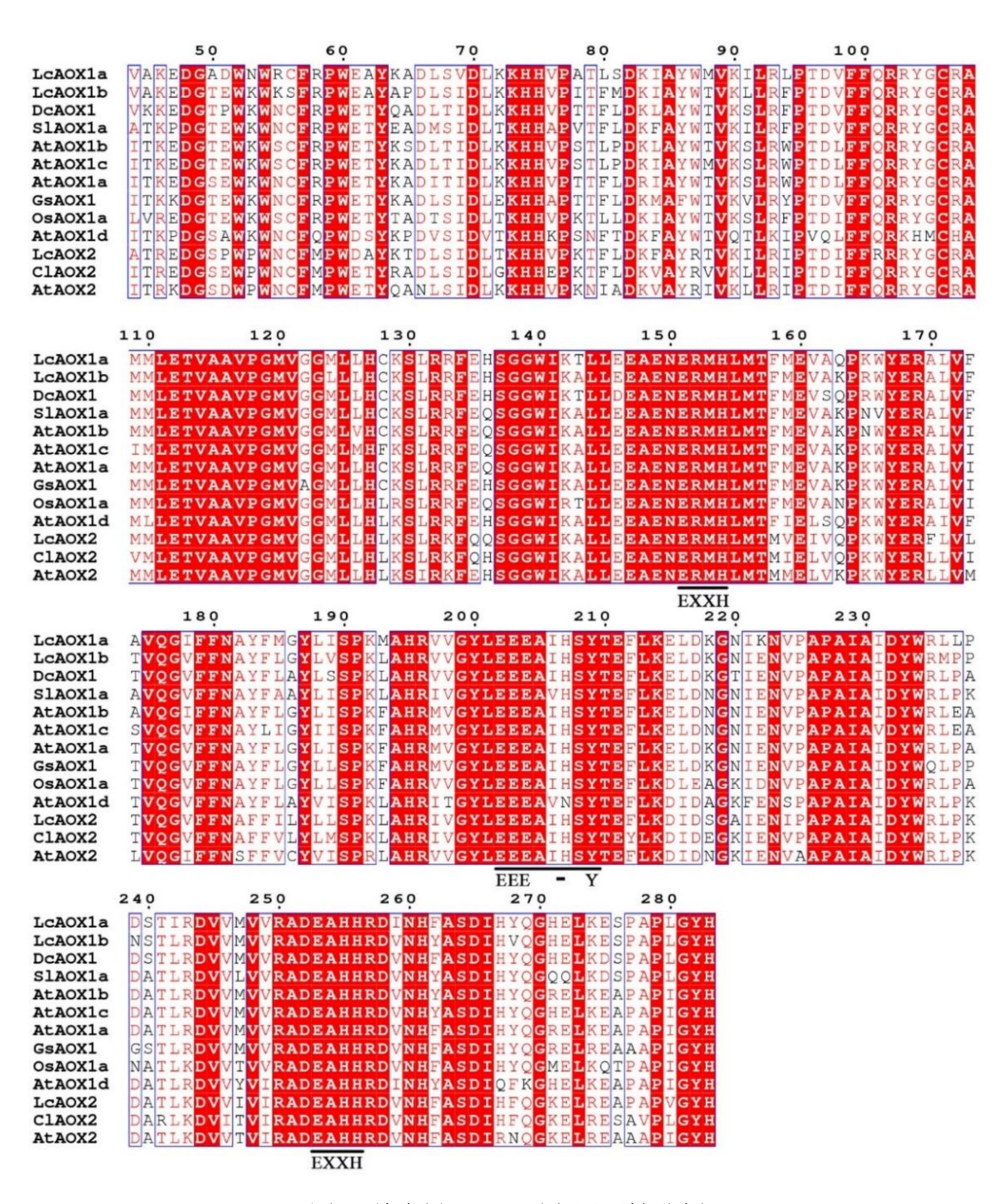


图 2 鹅掌楸 AOX 蛋白同源性分析

Fig.2 Homology analysis of *LcAOX* protein

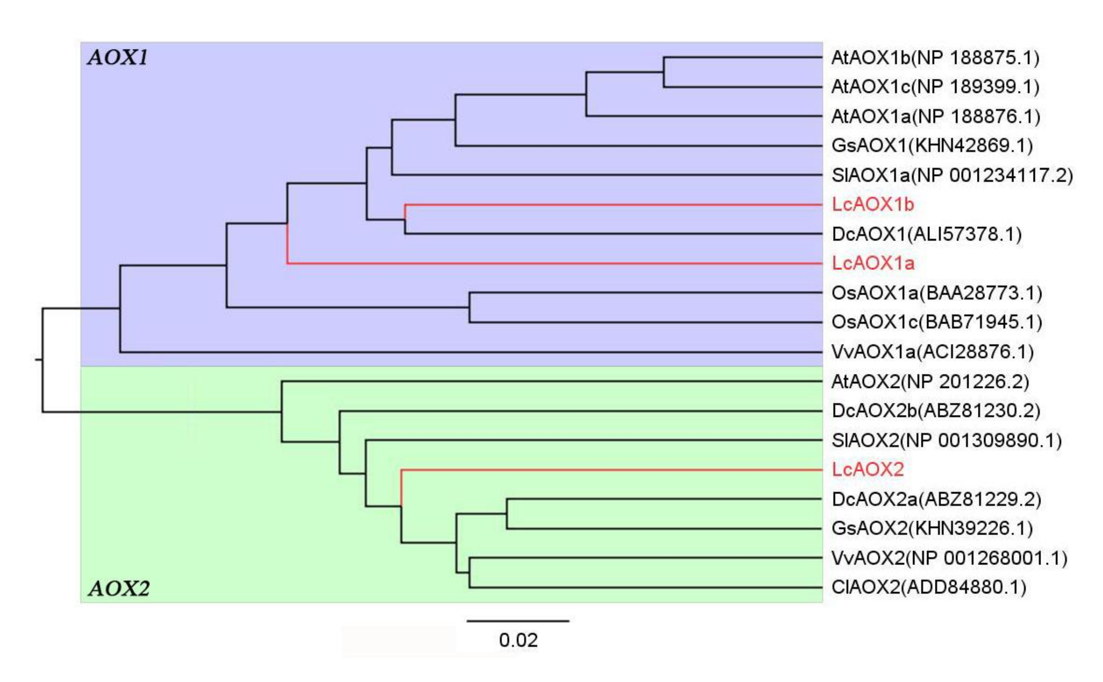


图 3 鹅掌楸 AOX 家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of *LcAOX*s

2.5 鹅掌楸 *AOX* 家族基因亚细胞定位预测

用 TargetP 在线软件进行亚细胞定位预测（表 2），结果显示 *LcAOX1a* 蛋白可能较多分布在除叶绿体、线粒体和分泌通路之外的其他位置；*LcAOX2* 蛋白定位于线粒体，且可信度等级为 2，具有较高可信度；而 *LcAOX1b* 在虽然在线粒体中分值最高，但其具体定位信息并不明确。为了使预测结果更加准确，我们使用 Wolfpsort 在线软件再一次进行 *LcAOX* 蛋白亚细胞定位预测（表 3），结果显示 *LcAOX1a* 蛋白最有可能定位于细胞质区域；*LcAOX2* 蛋白最有可能定位于线粒体中；而 *LcAOX1b* 蛋白在线粒体和叶绿体中均有定位，其具体定位信息仍需进一步实验验证。

表 2 TargetP 亚细胞定位预测

Table2 TargetP protein subcellular localization prediction

名称 Name	LcAOX1a	LcAOX1b	LcAOX2
叶绿体 cTP（chloroplastic）	0.106	0.091	0.082
线粒体 mTP（mitochondrial）	0.254	0.682	0.867
分泌通路 SP（secretory pathway）	0.072	0.011	0.006
其他 Other	0.848	0.070	0.020
定位预测 Loc（prediction of localization）	—	*	M
可靠性等级 RC（reliability class）	3	3	2

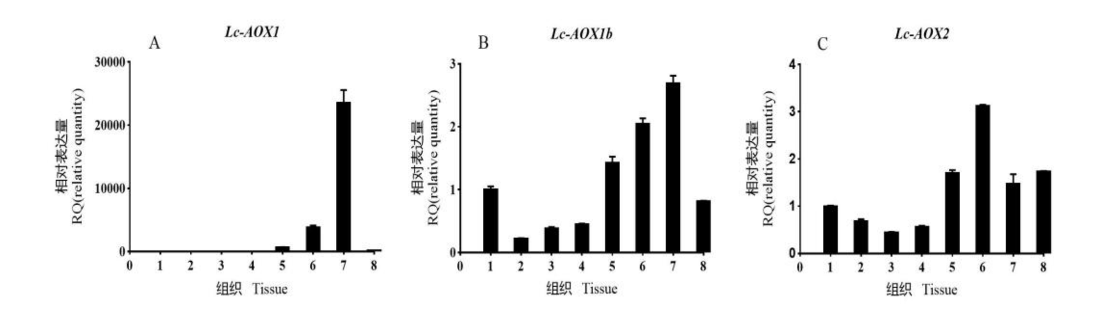
表 3 Wolfpsort 亚细胞定位预测

Table3 Wolfpsort protein subcellular localization prediction

名称 Name	LcAOX1a	LcAOX1b	LcAOX2
细胞核 Nuclear	—		—
细胞质 Cytoplasmic	9	1	1
线粒体基质 Mitochondrial matrix	4	6	6
叶绿体 Chloroplast	1	7	3

2.6 鹅掌楸 *AOX* 家族基因组织表达特性分析

分别提取鹅掌楸的 8 个组织总 RNA，以其反转录 cDNA 为模板，参考之前已发表的鹅掌楸 *Actin97* 作为内参基因（Tu et al., 2019），进行实时定量 PCR 反应。结果显示（图 4），三个 *AOX* 基因在花器官中表达量均明显高于其在营养器官中的表达量。其中鹅掌楸 *AOX1a* 在雄蕊中表达量极高，其次为花瓣，而在茎、叶片、叶芽等组织中表达量极低，仅有 1 左右；同样，*AOX1b* 基因在雄蕊中表达量最高，约为叶片的 2.69 倍，茎中表达量最低，只有叶片的 0.2 倍左右，而 *AOX2* 基因在花瓣中表达量最高，约为叶片表达量的 3 倍左右，叶芽中表达量最低。



注：**1.** 叶片；**2.** 茎；**3.** 叶芽；**4.** 花芽；**5.** 花萼；**6.** 花瓣；**7.** 雄蕊；**8.** 雌蕊。

Note: **1.** Leaf; **2.** Stem; **3.** Leaf bud; **4.** Flower bud; **5.** Calyx; **6.** Petal; **7.** Stamen; **8.** Pistil.

图 4 鹅掌楸 *AOX* 基因组织表达模式

Fig. 4 Tissue special expression of *LcAOXs*

3 结论与讨论

交替氧化酶为交替呼吸途径末端氧化酶，是由 *AOX* 基因控制编码的一类蛋白酶，Rhoads et al.（1991）在斑龙芋（*Sauromatum venosum*）中首次克隆出 *AOX* 基因并命名为 *AOX1*。随后，国内外学者对交替呼吸途径以及 *AOX* 基因进行了大量研究。迄今为止，几乎在所有的高等植物基因组中均检测到 *AOX* 基因的存在，而在动物中，只有极少数低等动物如原生生物中含有 *AOX* 基因（Mcdonald et al., 2004），此外，在真菌、细菌以及藻类中都有发现（Mcdonald et al., 2006）。*AOX* 基因家族是由核基因编码的一个较小的基因家族，通常被分为两个亚家族 *AOX1* 和 *AOX2*（Selinski et al., 2018），多数单子叶植物中往往仅含有 *AOX1* 亚家族，但天南星科植物如绿萍、红掌、绿萝等古老的单子叶植物中也检测到 AOX2 亚家

族的存在（Costa et al., 2017），此外，对石头松（*Pinus pinea*）的研究发现，其含有 AOX1 和 AOX2 两个亚家族，可以推断 AOX1 和 AOX2 两个亚家族出现在裸子植物与被子植物分离之前的时期，并且证明单子叶植物中也存在 AOX2 亚家族，可能在之后的进化发展中逐渐丢失了相关序列（António et al., 2009）；而双子叶植物除了极个别物种如杨树（*Populus*）外（杨树仅存在 *AOX1* 亚家族），均含有两个亚家族（张旭, 2014）。拟南芥 *AOX* 基因家族分析结果表明，共有 5 个 *AOX* 基因存在拟南芥中，其中有 4 个 *AOX1* 基因分别为 *AOX1a*、*AOX1b*、*AOX1c*、*AOX1d* 以及 1 个 *AOX2* 基因（Clifton et al., 2005；Saisho et al., 1997）。对大豆研究发现其存在 1 个 *AOX1* 基因和 2 个 *AOX2* 基因分别为 *AOX2a* 和 *AOX2b*（Thirkettle et al., 2003）。Ito et al.（1997）从水稻中分离鉴定出两个 *AOX* 基因，分别命名为 *AOX1a*、*AOX1b*，此后 Hiroaki，等进一步对水稻研究发现并命名 *AOX1c* 基因（Hiroaki et al., 2002），三者均为 *AOX1* 亚家族基因。本研究依据鹅掌楸多组织转录组数据筛选鉴定并克隆 3 个 *AOX* 家族基因 *LcAOX1a*、*LcAOX1b*、*LcAOX2*，系统发育分析结果表明鹅掌楸 *AOX* 基因同样分化为 *AOX1* 与 *AOX2* 两个亚家族。

根据"SUM"模型（Siedow & Umbach, 1995），*AOX* 蛋白在第一和第四个螺旋分别含有 1 个保守的"EXXH"，形成双铁羧酸活性中心，且在 C 端含有"FXHR"与"EEE-Y"的保守序列。而在此后 Andersson & Nordlund（1999）提出的"AN"模型中，*AOX* 在第二和第四个螺旋中含有"EXXH"保守序列，且活性中心仅位于第四个螺旋。本研究进行蛋白同源性分析发现鹅掌楸 *AOX* 家族 3 个基因均含有 *AOX* 家族特有的"EXXH"、"FXHR"、"EEE-Y"等铁离子结合的保守结构域，尤其在 C 端保守性极高。亚细胞定位预测结果显示 *LcAOX1a* 蛋白可能分布在除线粒体、叶绿体和分泌通路之外的其他位置；*LcAOX1b* 在叶绿体和线粒体中均有定位；*LcAOX2* 蛋白定位于线粒体，这与之前报道的对拟南芥 *AOX2* 基因进行亚细胞定位实验的结果一致，并且该研究发现 *AOX2* 基因在拟南芥萌发初期的交替呼吸途径中发挥重要作用（Saisho et al., 2001）。

组织表达分析结果表明鹅掌楸 *LcAOX1a*、*LcAOX1b* 与 *LcAOX2* 基因均在生殖器官中表达量较高，其中 *LcAOX1a* 与 *LcAOX1b* 基因在均雄蕊中表达量最高，特别是 *LcAOX1a* 基因在雄蕊中表达量远远高于其他组织。*AOX* 基因作为重要的线粒体末端氧化酶，在能量溢流和热能转化过程中具有重要的作用，然而在开花传粉期间，可能由于花器官需要热量维持活跃的代谢反应，因此表现出 *AOX* 活性的显著增强（Meeuse, 1975）。*LcAOX1a* 基因在雄蕊中特异性表达，雄蕊表达量是叶片的 2 万倍以上，推测该基因除了与非生物胁迫相关之外，可能与雄蕊发育密切相关。与此结果相似，在对大豆、棉花（*Gossypium* spp.）和拟南芥研究中发现 *AOX1* 基因均表现出雄蕊特异性表达，且 *AOX1* 基因的雄蕊特异性表达模式与细胞质雄性不育有着密切的关系（Shin et al., 2002；Li et al., 2013）。此外，对苏铁产热机制研究表明，雄球果产热明显高于雌球果，而独特的线粒体形态和 *CrAOX1* 介导的小孢子呼吸可能在球果产热中发挥重要作用（Yasuko et al., 2019）。也有一些研究表明 *AOX1* 基因的表达并不引起细胞质的雄性不育，而是与小孢子母细胞发育相关（Johns et al., 1993）。而 *LcAOX2* 基因同样在生殖器官中表达量更高，其中花瓣中表达量最高，其次为花萼和雌蕊。在西瓜和芒果的研究中发现 AOX2 在果实发育过程中有大量表达，推断 AOX2 可能与果实发育相关（李严曼，2011；Considine，2001）。拟南芥研究中发现 AOX2 在成熟的种子中表达量最高（Nakabayashi et al., 2005）。因此推测 AOX2 可能与植物生长发育密切相关。在对本研究通过对鹅掌楸 *AOX* 基因序列克隆并探讨其组织表达模式与功能之间的潜在关系，以期为今后进一步开展 *AOX* 家族基因生物学功能研究提供参考。

参考文献：

ANDERSSON ME, NORDLUND P, 1999. A revised model of the active site of alternative oxidase [J]. Febs Letters, 449(1): 17-22.

ANTÓNIO MF, ZAVATTIERI MA, CAMPOS MD, et al., 2009. The gymnosperm *Pinus pinea* contains both AOX gene subfamilies, AOX1 and AOX2 [J]. Physiol Plantarum, 137(4): 566-577.

BONNER W D, Rich P R. 1986. Partial purification and characterization of the quinol oxidase activity of *Arum maculatum* mitochondria [J]. Plant Physiol, 80(4): 838-842.

CHINNUSAMY V, Zhu J, Zhu J K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants[J]. Trends Plant Sci, 12(10): 0-451.

CLIFTON R, Lister R, Parker K L, et al., 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant MolBiol, 58(2): 193-212.

CONSIDINE, M. J. 2001. The Expression of Alternative Oxidase and Uncoupling Protein during Fruit Ripening in Mango [J]. Plant Physiol, 126(4): 1619-1629.

COSTA JH, SANTOS CPD , BEATRIZ DSEL , et al., 2017. In silico identification of alternative oxidase 2 (AOX2) in monocots: A new evolutionary scenario [J]. J Plant Physiol, 210: 58-63.

DOROTEIA C M, AMAIA N, CARDOSO HÉLIA G, et al., 2016. Stress-induced accumulation of DcAOX1 and DcAOX2a transcripts coincides with critical time point for structural biomass prediction in carrot primary cultures (*Daucus carota* L.) [J]. Frontiers Genet, 7: 1-17

HAO RM, HE SA, 1995. Geographical distribution of *Liriodendron chinense* in China and its significance [J]. J Plant Resour Environ, 4(1): 1-6. [郝日明，贺善安, 1995. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点 [J]. 植物资源与环境, 4(1): 1-6.]

HIROAKI S, KAZUHIRO O, SAWAKO H, et al., 2002. *AOX1c*, a novel rice gene for alternative oxidase, comparison with rice *AOX1a* and *AOX1b* [J]. Genes Genet Syst, 77(1): 31-38.

ITO Y, SAISHO D, NAKAZONO M, et al., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature [J]. Gene, 203(2): 121-129.

JIAN W, ZHANG DW, ZHU F, et al., 2016. Alternative oxidase pathway is involved in the exogenous SNP-elevated tolerance of *Medicago truncatula* to salt stress [J]. J Plant Physiol, 193: 79-87.

JOHNS C, NICKELS R, MCINTOSH L, et al., 1993. The expression of alternative oxidase and alternative respiratory capacity in cytoplasmic male sterile common bean [J]. Sexual Plant Reprod, 6(4): 257-265.

KEUNEN E, FLOREZ-SARASA I, OBATA T, et al., 2016. Metabolic responses of *Arabidopsis thalianaroots* and leaves to sublethal cadmium exposure are differentially influenced by alternative oxidase1a [J]. Environ Exp Bot, 124: 64-78

LI KQ, 2013. Studies on population genetics and molecular phylogeography of *Liriodendron*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University. [李康琴, 2013. 鹅掌楸属群体遗传结构及分子系统地理学研究[D]. 南京: 南京林业大学.]

LI Y, JIANG J, DU ML, et al., 2013. A cotton gene encoding *MYB-Like* transcription factor is specifically expressed in pollen and is involved in regulation of late anther/pollen development [J]. Plant Cell Physiol, 54(6): 893-906.

LI YM, ZHU L, YANG JH, et al., 2011. Cloning and analysis of the alternative oxidase-2(AOX2) gene in watermelon [J]. J Fruit Sci, 28(5):909-914.[李严曼，朱磊，杨景华，等. 2011. 西瓜交替氧化酶 AOX2 基因的克隆与分析 [J]. 果树学报, 28(5): 909-914.]

MCDONALD AE, VANLERBERGHE GC, 2004. Branched mitochondrial electron transport in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla [J]. Iubmb Life, 56(6): 333–341

MCDONALD AE, VANLERBERGHE GC, 2006. Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase [J]. Comparative Biochem Physiol Part D: Genom and Proteom, 1(3): 357-364.

MEEUSE BJ, 1975. Thermogenic respiration in Aroids [J]. Ann Review Plant Biol, 26(1): 117-126.

NAKABAYASHI K, OKAMOTO M, KOSHIBA T, et al., 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: Epigenetic and genetic regulation of transcription in seed [J]. Plant J, 41(5): 697-709.

RHOADS D M, MCINTOSH L, 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 88(6): 2122-2126.

SAISHO D, NAKAZONO M, LEE KH, et al., 2001. The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from Arabidopsis thaliana consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination [J]. Genes Genet Syst, 76(2): 89-97.

SAISHO D, NAMBARA E, NAITO S, et al., 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 35(5): 585-596.

SELINSKI J, SCHEIBE R, DAY DA, et al., 2018. Alternative Oxidase Is Positive for Plant Performance [J]. Trends Plant Sci, 23(7): 588-597.

SHIN B, CHOI G, HK YI, 2002. *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1[J]. Plant J, 30(1): 23-32.

SIEDOW JN, UMBACH AL, 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology [J]. Plant Cell, 7(7): 821-831.

THIRKETTLE-WATTS D, WHELAN J, 2003. Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean [J]. Plant Physiol, 133(3): 1158-1169.

TU Z, HAO Z, ZHONG W, et al., 2019. Identification of suitable reference genes for RT-qPCR assays in *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg [J]. Forests, 10(5): 441-456.

VANLERBERGHE GC, MCINTOSH L, 1997. *ALTERNATIVE OXIDASE*: From gene to function [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 48(1): 703-734.

YANG Y, XU M, LUO Q, et al., 2013. De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by Illumina sequencing [J]. Gene, 534(2): 155-62.

YASUKO II, Mayuko S, Mitsuhiko PS, et al. 2019. Alternative oxidase capacity of mitochondria in microsporophylls may function in cycad *Thermogenesis* [J]. Plant Physiol, 180(2): 734-756.

ZALUTSKAYA Z, LAPINA T, ERMILOVA E, 2015. The *Chlamydomonas reinhardtii* alternative oxidase 1 is regulated by heat stress [J]. Plant Physiol Biochem, 97: 229-234.

ZHANG X, 2014. The evolution and functional diversification of AOX gene family in *Populus euphratica* and *P. pruinose*[D]. Lanzhou: Lanzhou University. [张旭, 2014. 胡杨和灰杨 AOX 基因家族的进化分析及功能分化. [D]. 兰州: 兰州大学.]